

## 学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 4 1 0 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 1 月 2 0 日
氏 名	松 田 宏 幸		
論文題目	<p><math>\alpha</math> -galactosylceramide, a ligand of natural killer T cells, inhibits allergic airway inflammation (ナチュラルキラーT細胞のリガンドである<math>\alpha</math>-ガラクトシルセラミドはアレルギー性気道炎症を抑制する)</p>		

博士(医学) 松田 宏 幸

## 論文題目

$\alpha$ -galactosylceramide, a ligand of natural killer T cells, inhibits allergic airway inflammation

(ナチュラルキラーT細胞のリガンドである  $\alpha$ -ガラクトシルセラミドはアレルギー性気道炎症を抑制する)

## 論文の内容の要旨

### 〔はじめに〕

ナチュラルキラーT細胞(NKT細胞)は最近になり確立したT細胞の一種であり、重要な免疫調節機能を持っている。NKT細胞のT細胞レセプターはCD1に提示された糖脂質を認識しており、 $\alpha$ -ガラクトシルセラミド( $\alpha$ -GalCer)はそのリガンドの一つである。 $\alpha$ -GalCerにより活性化されたNKT細胞は、IFN- $\gamma$ やIL-4を産生することにより、腫瘍拒絶や自己免疫疾患などの免疫反応を調節することが報告されている。そして細胞は活性化されてIFN- $\gamma$ を産生しTh2反応を抑制する報告がある一方、IL-4の産生によりTh2反応を促進するとの報告もあり、 $\alpha$ -GalCerにより活性化されたNKT細胞が、アレルギー性炎症にいかなる作用を及ぼすかは明らかでない。今回、喘息モデルマウスを用い、 $\alpha$ -GalCerがアレルギー性気道炎症に及ぼす効果を検討した。

### 〔材料ならびに方法〕

マウス：8～10週齢のBALB/c野生型及びIFN- $\gamma$ ノックアウトマウスのメス。

抗原感作と曝露及び $\alpha$ -GalCer投与方法：day1、8に卵白アルブミン(Ovalbumin; OVA)を腹腔内投与後、day22、23、24にOVA溶液を経気道的に吸入させた。OVA溶液の吸入初日のday22に $\alpha$ -GalCerまたはvehicleを腹腔内投与した。

気管支肺胞洗浄(Bronchoalveolar lavage; BAL)：最終抗原曝露6または48時間後にBALを行った。BAL回収液を遠心分離法により細胞を分離し、その細胞数及び細胞分画の測定を行った。また、BAL上清液は、ELISA法を用いて各種サイトカインの測定を行った。

気道過敏性試験：最終抗原曝露後48時間にメサコリン投与による気道の閉塞を無拘束呼吸機能解析装置にて測定した。

肺組織：最終抗原曝露後48時間のマウスはBAL終了後に肺を摘出し、ホルマリン固定した。HE染色にて病理組織を検討し、また同時にPAS染色も行い気道上皮の杯細胞の過形成を計測した。

OVA特異的抗体：最終抗原曝露後48時間のマウスはBALと同時に採血も行い、血清中のOVA特異的IgE、IgG2aの測定をELISA法にて測定した。

### 〔結果〕

OVAにて感作した野生型のマウスでは、OVAを吸入曝露することにより、肺病理組織にて血管気道周囲に好酸球を中心とした炎症細胞浸潤が認められるが、 $\alpha$ -GalCerの投与によりこれらの炎症細胞浸潤が抑制された。また $\alpha$ -GalCer投与群では、vehicle群と比較し、BALでの総細胞数の減少に加え、細胞分画では好酸球・リンパ球分画が著明に減少した。そして $\alpha$ -GalCer投与群では、BAL上清中のTh2サイトカインであるIL-4、IL-5、IL-13の産生も減少を認めた。そして、 $\alpha$ -GalCer投与によりメサコリン負荷による気道過

敏性の亢進は抑制され、血清中のOVA特異的IgEの低下と共にIgG2aの上昇が認められた。また、喘息の病態の1つを表す気道上皮の杯細胞の過形成も $\alpha$ -GalCer投与群では抑制された。しかし、IFN- $\gamma$ ノックアウトマウスにおいては、野生型のマウスに認められたような $\alpha$ -GalCerによるアレルギー性気道炎症に及ぼす効果が認められなかった。

#### 〔考察〕

当研究において、マウス喘息モデルにおいてNKT細胞のリガンドである $\alpha$ -GalCerの投与が、アレルギー性気道炎症を抑制することが示された。またIFN- $\gamma$ ノックアウトマウスの結果から、 $\alpha$ -GalCerによるアレルギー性気道炎症の抑制にはIFN- $\gamma$ の産生が重要であると考えられた。気管支喘息はTh2細胞がその疾患の成立に中心的な役割を果たしている事が報告されている。最近の報告では、Th1サイトカインであるIL-12やIFN- $\gamma$ が抗原依存性の気道炎症や気道過敏性、Th2サイトカインの産生を抑制することが示されている。このことから、Th2反応優位である気管支喘息に関して、Th1へ偏向するような免疫療法が有効な治療手段の1つと考えられている。NKT細胞は活性化されてIFN- $\gamma$ を産生しTh2反応を抑制する報告がある一方、IL-4の産生によりTh2反応を促進するとの報告もある。今回の我々の結果では、 $\alpha$ -GalCerにより活性化されたNKT細胞はIFN- $\gamma$ を産生しTh2反応を抑制することによりアレルギー性の気道炎症を抑制したと考えられた。しかし、細胞の存在が気管支喘息の病態である気道過敏性に必須であるとの報告もあり、細胞のアレルギー性炎症の関与については、リガンドの種類などに左右される可能性があり、今後の更なる検討が必要と考えられた。

#### 〔結論〕

マウスの喘息モデルにおいて、 $\alpha$ -GalCerはそれより活性化されたNKT細胞を介したIFN- $\gamma$ の産生により、アレルギー性気道炎症を抑制することが考えられた。NKT細胞のリガンドが気管支喘息の治療の1つとなりうる可能性が考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

喘息は花粉症、アトピー性皮膚炎とならんで代表的なアレルギー疾患であり、小児期にアトピー性皮膚炎ではじまるアトピーマーチの重要なステップとなる。近年のアレルギー疾患増加に伴って喘息患者も全世界的に増えており、その予防・治療は重要な医療課題となっている。喘息はアトピー体質などのアレルギー素因のある個体に環境因子(アレルゲン、空気汚染物質など)が関与して生じる、好酸球浸潤と気道過敏を中心とする気道粘膜の炎症である。動物実験及びヒトでの経験から、Th2細胞が発症には中心的役割を果たすと考えられる。しかし、実際の炎症過程は極めて複雑で未だ解明されない面が多々ある。

申請者は重要な免疫調整機能を持つナチュラルキラーT細胞(NKT細胞)に着目して、複雑な喘息の病態の解明を試みた。NKT細胞は炎症環境により、インターフェロン $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )あるいはインターロイキン-4(IL-4)を産生して、アレルギー反応を抑制あるいは増強する。そこで、申請者は喘息モデルマウスにおいて、NKT細胞のリガンドである $\alpha$ -ガラクトシルセラミド( $\alpha$ -GalCer)を投与しこの細胞群を活性化し、アレルギー性気道炎症が抑制されるかあるいは増強されるのかを検討した。

用いられた動物、材料ならびに方法は適切であった。すなわち、喘息モデルを卵白アルブミン(OVA)

感作マウスに作製し、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の炎症細胞とサイトカインのプロフィール、気道過敏試験、肺病理組織像、OVA特異抗体産生に及ぼす $\alpha$ -GalCerの影響をみた。

得られた結果は以下の通りである。 $\alpha$ -GalCerを気道炎症の惹起前に投与した野生型マウスでは、対照群とくらべ、

- (1) BALF中の好酸球数が著明に低下し、IL-4、IL-5、IL-13の量が減少していた。
- (2) メサコリン負荷による気道過敏性の亢進が抑制されていた。
- (3) 病理組織では、好酸球の浸潤が抑制されていた。
- (4) 血清中のOVA特異的IgEレベルの低下とTh1誘導性IgG2a産生亢進がみられた。

さらに、IFN- $\gamma$ ノックアウトマウスでは、上記(1)～(4)でみられた $\alpha$ -GalCerのTh2反応抑制効果はみられなかった。

これらの結果から、マウス喘息モデルにおいて、 $\alpha$ -GalCerにより活性化されたNKT細胞はTh2優位の気道炎症を抑制すること、またそのメディエーターとしてIFN- $\gamma$ が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

本研究の注目すべき点は、喘息に伴うアレルギー性気道炎症がNKT細胞という極めてユニークな細胞群により制御されることを明らかにしたことである。従来アレルギー反応はTh1-Th2バランスにより症状が左右されることが分かっているが、本研究はアレルギー性気道炎症の複雑な病態の解明に大きく寄与した。また、 $\alpha$ -GalCerによりアレルギー炎症を抑制できたことは、NKT細胞のリガンドが気管支喘息の治療の一つになる可能性を示唆した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 気管支喘息の定義とメカニズムについて
- 2) アトピー性および非アトピー性喘息について
- 3) OVA特異的Th1、Th2細胞の誘導法について
- 4) NKT細胞のサイトカイン産生のメカニズムについて
- 5) マウス喘息モデルにおける抗原感作法について
- 6) BALF中のサイトカインレベルの測定法について
- 7) BALF中のサイトカインの由来について
- 8) ヒト喘息患者での末梢血中のIFN- $\gamma$ レベルについて
- 9) NKT細胞の気道過敏性への関与について

これらの質問の対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	瀧	川	雅	浩
	副査	宮	本	愛	副査 大西 一 功